

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PT/DE 99 / 03506
09/830981

REC'D 26 JAN 2000

WIPO PCT



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Herr Dr. Eberhard Hildt in München/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

„Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid“

am 3. November 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. Dezember 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ode".

Wehner

Aktenzeichen: 198 50 718.6

A 9161

06.90

11/98

1998

Unser Zeichen: F 1701 - hu / wd

Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid 5 kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.

Mit Zellpermeabilität wird die Eigenschaft von Substanzen bezeichnet, in Zellen einzudringen. Diese Eigenschaft findet sich allerdings nur bei wenigen Substanzen. Die meisten Substanzen benötigen Hilfsmittel bzw. Verfahren, um in Zellen einzudringen. Beispiele hierfür sind Mikroinjektion, Elektroporation, Assoziation mit kationischen Lipiden, Liposomenbildung, Rezeptor-vermittelte Endozytose und Virusinfektion. Diese Hilfsmittel bzw. Verfahren weisen jedoch große Nachteile auf. Insbesondere sind sie teuer, erfordern komplexe Versuchsanordnungen und sind nur begrenzt einsetzbar. Ferner ist ihre Effizienz gering und sie erweisen sich oft als toxisch.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde ein Mittel bereitzustellen, mit dem Substanzen in Zellen eingebracht werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen 25 erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt, in Zellen eindringen kann, d.h. Zellpermeabilität aufweist. Er hat ein solches Polypeptid in der PreS2-Region eines Hepatitis B Virus (HBV)-Oberflächenproteins

gefunden. Das Polypeptid wird nachstehend mit ZPP "Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid" bezeichnet. ZPP weist die Struktur einer amphiphilen α -Helix auf. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß ZPP die Eigenschaft hat, Zellpermeabilität an Substanzen zu vermitteln. Diese können dann in Zellen eindringen, wobei die Zellpermeabilität der Substanzen nicht auf bestimmte Zellen beschränkt ist. Auch behalten die Substanzen ihre Aktivitäten bei (vgl. Fig. 2).

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Polypeptid (ZPP) bereitzustellen, das Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann,

wobei ZPP die Sequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt und kein natives HBV-Oberflächenprotein ist und die DNA der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert.

Der Ausdruck "Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen" weist darauf hin, daß ZPP Zellpermeabilität an Substanzen jeglicher Art und Abstammung vermitteln kann. Die Substanzen können z.B. Polypeptide (Proteine), Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen sein. Beispiele von Polypeptiden sind Struktur-Polypeptide, Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Zytokine, wie IL-2, und GM-CSF, und kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, tumorassoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden, Hormone und Ribozyme sein. Beispiele von Nukleinsäuren sind solche, die für vorstehende Polypeptide kodieren. Ferner können es Antisense-Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren und Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren sein. Beispiele von chemischen Verbindungen sind Arzneimittel, die keine Polypeptid-Struktur aufweisen. Solche können Cytostatika,

Anästhetika, Antihistaminika, Antibiotika und Antimycotika sein. Zur Vermittlung der Zellpermeabilität kann es ausreichend sein, wenn ZPP zusammen mit einer Substanz inkubiert wird, so daß sich chemische Bindungen, z.B. kovalente bzw. nicht-kovalente Bindungen, ausbilden können. Günstig ist es, wenn ZPP über einen Linker mit der Substanz verbunden ist, wobei dies z.B. über Biotin/Streptavidin erfolgen kann. Der Linker kann am N- oder C-Terminus von ZPP vorliegen. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Substanz als Polypeptid zusammen mit ZPP in einem Fusionspolypeptid vorliegt. ZPP kann hierbei am N- oder C-Terminus bzw. innerhalb der Polypeptid Struktur der Substanz vorliegen. Der Ausdruck

- 10 "ZPP" umfaßt daher auch ein Fusionspolypeptid, in dem ZPP zusammen mit einer Substanz vorliegt. Die Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen kann durch übliche Verfahren nachgewiesen werden. Günstig ist es, Zellen mit ZPP verbundenen Substanzen zu inkubieren und das Eindringen bzw. Vorliegen von ZPP und/oder den Substanzen in den Zellen nachzuweisen. Dies kann z.B. 15 durch spezifische Antikörper oder Reagenzien erfolgen, die direkt oder indirekt mit ZPP bzw. den Substanzen reagieren.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche für ein ZPP kodierende Aminosäuresequenz, deren DNA-Sequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der Sequenz, hin.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ZPP kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 30 (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybri-

disiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert, oder

- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

5

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein ZPP kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen,

10 Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen entsprechend verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in einem Vektor vorliegen.

15 Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, 20 cDM8, pCEV4, pCDNA3, pCSV10, pRCMV und pRK5 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

25 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 und M15pRep4, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Hep62, CCL13 und 293, die Insektenzellen Sf9 und Sf21 und die Pflanzenzellen *Lupinus albus*.

30

Der Fachmann kennt Verfahren und Bedingungen, Zellen mit einem, die erfindungsgemäße DNA enthaltenden Expressionsvektor zu transformieren bzw.

transfizieren und die Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte ZPP zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ZPP gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit ZPP zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können ebenfalls mit ZPP erfolgen. Der polyklonale Antikör-

per kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) ein erfindungsgemäßes Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP),
- (b) eine erfindungsgemäße DNA,
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es Zellpermeabilität zu vermitteln. Mit einem erfindungsgemäßen ZPP kann Zellpermeabilität an Substanzen jeglicher Art und Abstammung vermittelt werden. Die Zellpermeabilität ist universell, d.h. sie ist nicht auf bestimmte Zellen beschränkt. Auch können die Zellen ex vivo bzw. in vivo vorliegen. Desweiteren löst die Zellpermeabilität keine toxischen Effekte aus.

Die vorliegende Erfindung eignet sich somit bestens für Diagnose und Therapie. Letzteres umfaßt das Eingreifen in die Expression von Genen und in Stoffwechselprozesse. Besonders eignet sich die vorliegende Erfindung für die Diagnose und Therapie schwerster Erkrankungen, z.B. von Tumoren. Ganz besonders 5 zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie sowohl für konervative als auch gentherapeutische Behandlungsmaßnahmen eingesetzt werden kann.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

10

Fig. 1 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßigen, Zellpermeabilität-vermittelnden Polypeptids (ZPP).

15

Fig. 2 zeigt den Nachweis von durch ZPP vermittelter Zellpermeabilität. Die Spuren 2 und 3 zeigen die Aktivierung von c-Raf1-Kinase. Die Spuren 4 und 5 zeigen deren Hemmung. Die Spuren 6 und 7 zeigen, daß mutiertes ZPP-PLAP (ZPP-KLAP) keine Hemmwirkung aufweist.

20

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis von durch ein erfindungsgemäßes Polypeptid (ZPP) vermittelter Zellpermeabilität.

25

Der Nachweis einer durch ZPP-vermittelten Zellpermeabilität wird durch Hemmung der TNF α -abhängigen Aktivierung von c-Raf1-Kinase gezeigt. Die Aktivierung der c-Raf1-Kinase beruht auf der Interaktion des TNF-Rezeptors I (TNF-RI) mit dem Adaptermolekül Grb2. Hierzu interagiert die SH3-Domäne von Grb2 mit einem PLAP-Motiv aus der cytoplasmatischen Domäne von TNF-RI.

30

Es wird ZPP in Form eines Fusionspolypeptids bereitgestellt. In diesem mit ZPP-PLAP bezeichneten Fusionspolypeptid liegt ZPP der Aminosäuresequenz von Fig.

1 als N-Terminuspartner und ein PLAP-Motiv aus der cytoplasmatischen Domäne von TNF-RI als C-Terminuspartner vor. Ferner wird ein mit ZPP-KLAP bezeichnetes Fusionspolypeptid bereitgestellt, bei dem das PLAP-Motiv mutiert ist.

5 HeLa Zellen werden 2 h mit $2\mu\text{M}$ ZPP-PLAP bzw. ZPP-KLAP (Kontrolle) inkubiert und 15 min mit $100\mu\text{/ml}$ $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Die Aktivierung von c-Raf1 Kinase wird durch einen Immunkomplex-Test unter Verwendung von MEK (Santa Cruz, Biotech) und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP als Substrat bestimmt (vgl. Fig. 2).

10 Es zeigt sich, daß ZPP-PLAP in die Zellen gelangt und die Aktivierung von C-Raf1-Kinase vollständig hemmt (vgl. Fig. 2, Spuren 4 und 5). Ferner zeigt sich, daß ZPP-KLAP keine Hemmung erreicht (vgl. Fig. 2, Spuren 6 und 7).

15 **Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Zellpermeabilität-vermittelnden Polypeptids (ZPP).**

Die DNA von Fig. 1 wird am 5'-Ende mit einem BgIII-Linker und am 3'-Ende mit einem BamHI-Linker versehen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgespalten. Das erhaltene BgIII/BamHI-Fragment wird in den BamHI-gespaltenen Expressionsvektor pQe8 inseriert, so daß das Expressionsplasmid pQe8/ZPP erhalten wird.

25 Ferner wird aus dem Expressionsplasmid pGex-1 die eine für GST (Glutathion-S-Transferase) kodierende Sequenz isoliert. Diese weist an ihrem 5'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle gefolgt von einer für eine Thrombinschnittstelle kodierenden Sequenz auf. Ferner weist die Sequenz an ihrem 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle auf. Die Sequenz wird in das BamHI-gespaltene Expressionsplasmid pQe8/ZPP inseriert, wodurch das Expressionsplasmid pQe8/ZPP-GST erhalten wird. Dieses kodiert für das Fusionspolypeptid ZPP-GST, pQe48/ZPP-GST wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien

- 8 -

werden in einem LB-Medium mit $100\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und $25\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin kultiviert und 4 h mit $60\mu\text{M}$ Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert.

Nach Induktion wird mittels Ultraschall die Lyse der sedimentierten und gewaschenen Bakterien durchgeführt. Die Isolierung des ZPP-GST-Fusionspolypeptids

5 erfolgt mittels Affinitätschromatographie an einer Glutathion-Säule. Das gebundene ZPP-GST-Fusionspolypeptid wird mittels eines linearen Anstiegs der Glutathion-Konzentration von 0 auf 10 mM eluiert. Das eluierte ZPP-GST Fusionsprotein wird einer Thrombinspaltung unterzogen. Das dadurch freigesetzte Hexa-His-ZPP (Fusionspolypeptid) wird anschließend durch Affinitätschromatographie

10 unter denaturierenden Bedingungen mittels einer Ni-NTA-Agarose isoliert. Dies erfolgt in Gegenwart von 6 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen). Das gebundene Hexa-His-ZPP wird in einem Puffer mit pH 6,3 eluiert, der 250 mM Imidazol enthält. Das Hexa-His-ZPP wird einer 18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau 15 angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)polypeptid in hochreiner Form hergestellt werden kann.

20

Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid von Beispiel 2 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M 25 Natriumacetat wird eine ca. 3 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionspolypeptid werden Tiere wie folgt immunisiert:

30

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

5 Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)

Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfunden

10 dungsgemäßes Fusionspolypeptid von Beispiel 2 einer SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 15 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschriften mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 20 37°C folgen mehrere Waschschrifte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

25 Es zeigt sich, daß erfundungsgemäß, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

30 Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- 10 -

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

5 Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

10 Pro Immunisierung werden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

15 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

20 Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP), wobei ZPP die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt und kein natives HBV-Oberflächenprotein ist und wobei die DNA-Sequenz der letzteren 5 Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert.

2. Nukleinsäure, kodierend für ZPP nach Anspruch 1.

10 3. Nukleinsäure nach Anspruch 2, wobei die Nukleinsäure eine DNA ist.

15 4. DNA nach Anspruch 3, umfassend:

- (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert, oder
(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.

6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.

7. Verfahren zur Herstellung von ZPP, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.

25

8. Antikörper, gerichtet gegen ZPP nach Anspruch 1.

9. Verwendung von ZPP nach Anspruch 1 zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.

- 12 -

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Substanzen Polypeptide, Nukleinsäuren und chemische Verbindungen umfassen.
-
-

Unser Zeichen: F 1701 - hu / wd

Zusammenfassung

Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.

1/2

P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT

Fig. 1

2/2

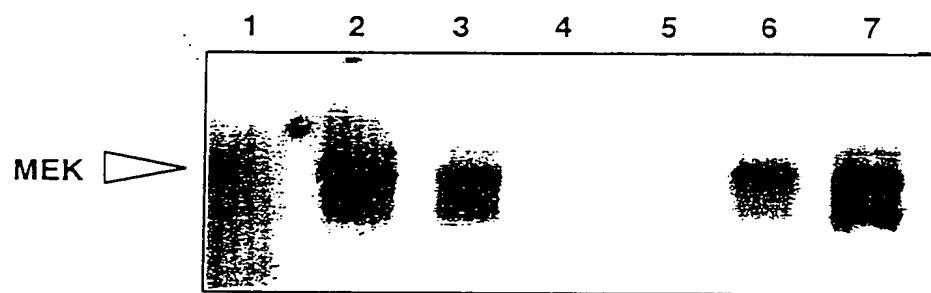


Fig. 2